

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07703

研究課題名(和文) ヒト樹状細胞を標的とした新規免疫チェックポイント阻害剤の開発

研究課題名(英文) Development of novel immune checkpoint inhibitors targeting human dendritic cells

研究代表者

宇都 倫史 (Uto, Tomofumi)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：10624653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がん進展での免疫応答抑制に関与する新規免疫チェックポイント分子として推察されたヒトCLEC4Aに着眼し、機能阻害抗体によるこれらを標的としたがん免疫治療法の有用性を検討した。ヒト末梢血単核球におけるヒトCLEC4Aの発現を解析した結果、B細胞と比較しCD11c+樹状細胞とCD14c+細胞においてCLEC4Aの高発現が認められた。抗ヒトCLEC4A機能阻害抗体を投与したマウスでは、体重変化および、皮膚、腎臓、肝臓、消化管における組織障害は観察されなかった。担がん免疫系ヒト化マウスに抗ヒトCLEC4A機能阻害抗体を投与した結果、悪性黒色腫のがん進展が抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、T細胞関連免疫チェックポイント分子阻害剤が臨床応用されているが、主としてT細胞発現分子であり、樹状細胞に発現する分子の作用機序に着目した報告は皆無であることから、新規樹状細胞発現免疫チェックポイント分子の発見は学術的にも社会的にも大きな意義がある。抗ヒトCLEC4A機能阻害抗体の研究開発は、新たながん免疫治療戦略を導き将来的な医療応用に展開されることが強く期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aim to prove the concept of the effectiveness of tumor immunotherapy with antagonistic anti-human CLEC4A monoclonal antibody (mAb) as a novel immune checkpoint inhibitor for the development of the tumor immunotherapy targeting human CLEC4A. Human type 2 dendritic cells and monocytes displayed the higher expression of CLEC4A than B cells. Antagonistic mAb to human CLEC4A exerts the protection against the established tumor without any apparent signs of immune-related adverse events in hCLEC4A-transgenic mice.

研究分野：免疫学分野

キーワード：腫瘍治療学 免疫抑制 樹状細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイントは免疫系の自己反応性を防ぐ免疫抑制機構であり、免疫チェックポイント分子として、現在までにT細胞に発現するCTLA-4やPD-1が挙げられる。一方、がん抗原の多くが正常自己抗原であるため免疫原性が弱く、がん細胞が免疫監視機構から逃れる「がんの免疫逃避機構」が知られており、この機序には上述の免疫チェックポイント分子が関与することが明らかとなっている。さらに近年、CTLA-4/PD-1系に対する機能障害抗体ががん免疫治療の免疫チェックポイント阻害剤として臨床応用されている。しかしながら、一定の臨床効果が得られてはいるもののいまだ満足すべき結果ではない。

申請者は先にマウスにおいてClec4A4が通常型樹状細胞(cDCs)の活性化制御分子として免疫応答を負に調節することを解明した。さらに、Clec4A4欠損がcDCsの機能抑制解除に基づくがん特異的T細胞応答の増強を介して、有効ながん免疫応答の成立を導き、がん進展を抑制することを解明した。

### 2. 研究の目的

本研究では、がん進展での免疫応答抑制に関与する新規免疫チェックポイント分子として推察されたマウスClec4A4およびそのオルソログであるヒトCLEC4Aに着眼し、機能障害抗体によるこれらを標的としたがん免疫治療法の有用性を解明する。本研究により、新規DC発現免疫チェックポイント阻害剤のがん進展に対する抑制効果と作用機序を初めて証明することが挙げられる。また、これまで未知であったがん免疫抑制機構に関するDC機能の重要性が解明されることで新たな概念の提唱が期待できる。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト免疫細胞における抗ヒトCLEC4A機能障害抗体の正常標的細胞の解析を行う。

(2) 抗ヒトCLEC4A機能障害抗体を用いたヒト細胞のToll様受容体(TLR)刺激によるサイトカイン産生の解析を行う。

(3) 抗ヒトCLEC4A機能障害抗体を用いた細胞内シグナル伝達の解析を行う。

(4) 担がん免疫系ヒト化マウスモデルにおける抗ヒトCLEC4A機能障害抗体の免疫チェックポイント阻害機能について解析する。

ヒト末梢血単核球(HLA-A2+)とヒト悪性黒色腫細胞株(MEL-624; HLA-A2+MART-1+gp100+)を用いた担がん免疫系ヒト化マウスモデルにおいて、(4-1)抗ヒトCLEC4A機能障害抗体のがん特異的T細胞応答増強効果および、(4-2)抗がん進展制御効果を評価する。

(5) 担がんマウスモデルにおける抗マウスClec4A4機能障害抗体の免疫チェックポイント阻害機能の解析を行う。

(6) 抗ヒトCLEC4A機能障害抗体の安全性について解析する。

### 4. 研究成果

(1) ヒト末梢血単核球及び樹状細胞(DC)亜集団におけるヒトCLEC4Aの発現を、抗ヒトCLEC4A機能障害抗体を用いてフローサイトメトリー解析にて確認した。その結果、ヒト末梢血単核球におけるCLEC4Aの発現は、CD19+B細胞と比較して、CD11c+DCsとCD14c+細胞において高発現が認められた。また、CD11c+DCs亜集団では、CD141+通常型DC(cDC1)とCD303+形質細胞様DC(pDC)と比較して、CD1c+cDC2においてCLEC4Aの優位な高発現が認められた。さらに、単球由来成熟樹状細胞(Mo-mDCs)では、CLEC4Aの発現レベルが単球由来未熟樹状細胞(Mo-iDCs)と比べ低下していた。

(2) 抗ヒトCLEC4A機能障害抗体を用いて、ヒト単球およびMo-iDCのToll様受容体(TLR)刺激によるサイトカイン産生を解析した。その結果、コントロール抗体と比較して、抗ヒトCLEC4A機能障害抗体では、TLR誘導性サイトカインの産生増強が認められた。

(3) CLEC4A-CD3 発現NFAT-GFPレポーター細胞におけるGFP発現を測定した結果、コントロール抗体と比較して、抗ヒトCLEC4A機能阻害抗体ではGFPの発現低下が認められた。

(4-1) 担がん免疫系ヒト化マウスにコントロール抗体や抗ヒトCLEC4A機能阻害抗体を投与後、所属リンパ節を回収し、抗体非投与群やコントロール抗体投与群を対照として、抗原特異的CTLs (IFN- $\gamma$  産生MART-1/gp100-MHCクラスIテトラマー結合CD8+ T細胞) の誘導をフローサイトメトリー解析により比較検討した。その結果、抗ヒトCLEC4A機能阻害抗体投与群では、コントロール抗体投与群と比較して、高い抗原特異的CTLsの誘導が認められた。

(4-2) 担がん免疫系ヒト化マウスにコントロール抗体や抗ヒトCLEC4A機能阻害抗体を投与後、抗体非投与群やコントロール抗体投与群を対照として、がん体積と生存率を比較検討した。その結果、コントロール抗体投与群と比較して、抗ヒトCLEC4A機能阻害抗体投与群では、悪性黒色腫のがん進展が抑制された。

(5) 卵白アルブミン (OVA) 発現組換えマウス悪性黒色腫細胞株 (B16-OVA) を用いた担がんマウスモデルにおいて、抗マウスClec4A4機能阻害抗体のがん特異的T細胞応答増強効果、がん組織浸潤免疫細胞促進効果、抗がん進展制御効果を評価した。その結果、抗マウスClec4A4機能阻害抗体投与群はコントロール抗体投与群と比較して有用性は得られなかった。これは、抗マウスClec4A4抗体が生体内において機能しない事が示唆され、新たな抗マウスClec4A4機能阻害抗体を作製中である。

(6) B16-OVAを用いた担がんマウスモデルにおいて、コントロール抗体や抗ヒトCLEC4A機能阻害抗体を投与後、抗体非投与群やコントロール抗体投与群を対照として、体重変化と組織 (肺、肝臓、消化管、腎臓、皮膚) 障害の発生の有無を比較検討した。その結果、抗体非投与群やコントロール抗体投与群と比較して、抗ヒトCLEC4A機能阻害抗体投与群では体重変化および、皮膚、腎臓、肝臓、消化管における組織障害は観察されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nasu J., Uto T., Fukaya T., Takagi H., Fukui T., Miyanaga N., Nishikawa Y., Yamasaki S., Yamashita Y., Sato K.	4. 巻 32
2. 論文標題 Pivotal role of carbohydrate recognition domain in self-interaction of CLEC4A to elicit the ITIM-mediated inhibitory function in murine conventional dendritic cells in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International immunology	6. 最初と最後の頁 673-682
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxaa034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宇都倫史、深谷知宏、高木秀明、西川陽太郎、富永萌、佐藤克明
2. 発表標題 Clec4A4 acts as immune checkpoint molecule expressed on conventional dendritic cells to suppress tumor immunity
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇都倫史、深谷知宏、三苫修也、富永萌、佐藤克明
2. 発表標題 DCIR2 is an immune regulatory molecule expressed on conventional dendritic cells to suppress tumor immunity
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 宇都倫史、深谷知宏、三苫修也、佐藤克明	4. 発行年 2023年
2. 出版社 化学工業	5. 総ページ数 7
3. 書名 樹状細胞を標的とした新規免疫チェックポイント阻害剤の開発	

1. 著者名 宇都倫史, 深谷知宏, 三苦修也, 佐藤克明	4. 発行年 2023年
2. 出版社 腫瘍内科	5. 総ページ数 7
3. 書名 樹状細胞を標的とした免疫チェックポイント阻害療法	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------